

METHOD FOR CONTROLLING QUALITY IN THE CONSTRUCTION OF OLIGOMER GRIDS

Patent number: WO0015837
Publication date: 2000-03-23
Inventor: BEIER MARKUS (DE)
Applicant: DEUTSCHES KREBSFORSCH (DE); BEIER MARKUS (DE)
Classification:
 - international: C12Q1/68
 - european: B01J19/00C, C12Q1/68B10A
Application number: WO1999DE02975 19990915
Priority number(s): DE19981042164 19980915

Also published as:

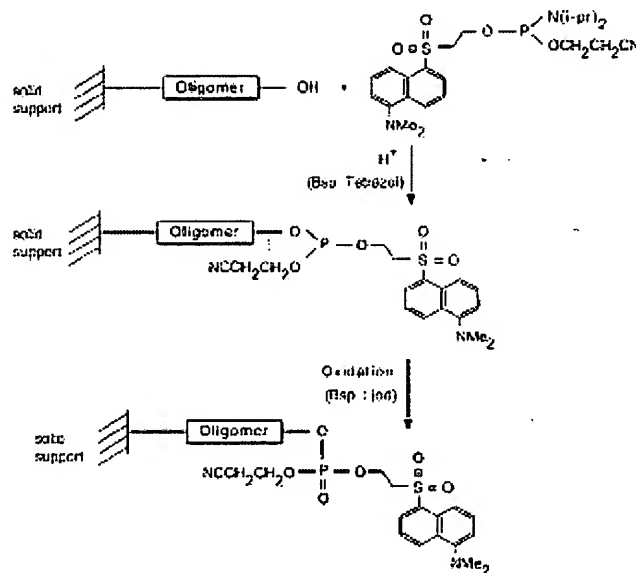
WO0015837 (A3)
 EP1114186 (A3)
 EP1114186 (A2)
 US6582917 (B1)
 DE19842164 (A1)

Cited documents:

EP0818460
 DE19625397
 EP0475443
 WO9739151
 WO9408047

Abstract of WO0015837

The invention relates to a method for controlling the quality of oligomer grids. The method is characterised in that a phosphate unit is fused to certain grid positions (if it is not already fused to said grid positions), said phosphate unit being linked to a signal-generating reporter group, the degree of oligomer synthesis is determined using the signal of the reporter group, and the reporter group is then split off again.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(51) Internationale Patentklassifikation ⁷: C12Q 1/68	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/15837 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. März 2000 (23.03.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02975 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. September 1999 (15.09.99) (30) Prioritätsdaten: 198 42 164.8 15. September 1998 (15.09.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEIER, Markus [DE/DE]; Werdenstrasse 42a, D-69120 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: METHOD FOR CONTROLLING QUALITY IN THE CONSTRUCTION OF OLIGOMER GRIDS (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE BEIM AUFBAU VON OLIGOMERRASTERN (57) Abstract <p>The invention relates to a method for controlling the quality of oligomer grids. The method is characterised in that a phosphate unit is fused to certain grid positions (if it is not already fused to said grid positions), said phosphate unit being linked to a signal-generating reporter group, the degree of oligomer synthesis is determined using the signal of the reporter group, and the reporter group is then split off again.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man an bestimmte Rasterpositionen eine Phosphateinheit, die mit einer signalgebenden Reportergruppe verknüpft ist bzw. wird, ankondensiert, anhand des Signals der Reportergruppe den Grad der Oligomersynthese bestimmt und anschließend die Reportergruppe wieder abspaltet.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshen	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zur Qualitätskontrolle beim Aufbau von Oligomerrastern

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Qualitätskontrolle beim Aufbau von Oligomerrastern.

Für diagnostische Screenings werden Mikrochips mit Oligomeren in Form von Rastern beschichtet (Oligomerschips/Biochips). Mit diesen kann dann eine Probe nach einem passenden, d.h. damit hybridisierenden, Molekül abgesucht werden. Solche Oligomerraster auf einem Chip können aus Nucleinsäureoligonukleotiden, wie DNA-, RNA- oder Nucleinsäurebiopolymeren oder analogen Verbindungen dazu bestehen, die auf einer festen Phase aufgebracht sind.

Die Fixierung der Oligomeren erfolgt nicht immer quantitativ, so daß nicht immer Chips mit dem gleichen Beschichtungsgrad erhalten werden. Nach dem Aufbau solcher Oligomerraster muß daher überprüft werden, ob die Synthese erfolgreich verlaufen ist, bzw. der Grad der erfolgreichen Synthese muß ermittelt werden. Bisher wurden hierzu mit einem permanenten (Fluoreszenz)label versehene Phosphatreagenzien verwendet. Da diese Label nicht wieder abgespalten werden konnten, beeinträchtigen sie ggf. die anschließende Verwendung des Biochips.

Ein definierter Qualitätsassay für den Aufbau von Oligomerrastern auf einer Chipoberfläche, der keine störenden Nebeneffekte auslöst, ist daher bisher nicht bekannt. Auf dem noch in der Entwicklung begriffenen Gebiet der Biochip-Technologie ist jedoch eine Qualitätskontrolle unumgänglich, um eine reproduzierbare Herstellung gleicher Qualität zu gewährleisten.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern bereitzustellen. Das Verfahren soll universell einsetzbar

sein und sich mit geringem Aufwand rasch durchführen lassen. Ferner soll durch die Qualitätskontrolle die anschließende Verwendung als Biochip nicht beeinträchtigt werden. Das Verfahren soll sich für alle Arten von Oligomerrastern eignen.

Diese Aufgabe wird durch ein Verfahren gemäß Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß eine Qualitätskontrolle ohne Beeinträchtigung der weiteren Verwendung des Chips durchgeführt werden kann, wenn an das sich auf dem Chip befindliche Oligomerraster eine Phosphateinheit ankondensiert wird, die reversibel mit einer signalgebenden Reportergruppe versehen ist bzw. mit einer solchen verbunden wird. Durch Detektion des Signals der an die Oligomeren an den Rasterpositionen gebundenen Reportergruppe kann der Erfolg der Synthese kontrolliert werden, bzw. verschiedene Rasterpositionen können miteinander verglichen werden. Nach erfolgter Qualitätskontrolle wird die Reportergruppe wieder abgelöst.

Die Erfindung betrifft somit ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man an Oligonukleotide an bestimmten Rasterpositionen (vorzugsweise an alle oder an eine vorher ausgewählte Anzahl) eine Phosphateinheit, die mit einer signalgebenden Reportergruppe verknüpft ist bzw. wird, ankondensiert, anhand des Signals der Reportergruppe den Grad der Oligomersynthese bestimmt und anschließend die Reportergruppe wieder abspaltet. Ein allgemeines Schema ist in Fig. 5 bzw. 6 gezeigt.

Durch Detektion der von den besetzten Rasterpositionen ausgehenden Signalen der Reportergruppe kann der Umfang des Syntheserfolgs kontrolliert werden. Nach erfolgter Qualitätskontrolle kann die Reportergruppe wieder abgespalten werden und führt so bei den anschließenden Experimenten zu keinerlei störenden Effekten. Lediglich die Phosphatgruppe bleibt mit den Oligomeren verbunden. Sie stört jedoch die nachfolgende Verwendung, z.B. bei einer Hybridisierung, nicht, sondern erhöht ggf. vorteilhafterweise zudem noch die Schmelztemperatur des an

die feste Phase gebundenen Oligomers.

Erfindungsgemäß soll unter einer Phosphateinheit eine solche durch Methoden der Phosphoramidit-Chemie aufkondensierte Einheit verstanden werden. Desweiteren können die Phosphateinheiten auch durch bekannte Verfahren der Phosphormonoester-, Phosphordiester- oder H-Phosphonat-Chemie erzeugt werden.

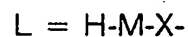
Nachfolgend wird die Erfindung anhand von Phosphoramidit als Basis der Phosphatgruppe beschrieben, was erfindungsgemäße bevorzugt ist. Dies ist jedoch nicht als Beschränkung auszulegen. Erfindungsgemäß wird die Phosphateinheit durch Reaktion des bereits an der festen Phase befindlichen Oligomers an dessen 5'-oder 3'-Ende mit dem Phosphoramidit nach Oxidation erzeugt. Hierbei wird das Phosphoramidit unter Zuhilfenahme eines aciden Katalysators (z.B. Tetrazol, Tetrazol-Derivate, Pyridinhydrochlorid) mit dem an der festen Phase befindlichen Oligomer-Strang umgesetzt. Nachfolgende Oxidation, z.B. mit Jod, tert-Butylhydroperoxid etc., ergibt eine stabile Phosphor(V)-Verbindung (=Phosphateinheit). Vorteilhaft erweist sich, daß man sich hierbei der üblichen Schritte der Synthese von Oligonukleotiden bedienen kann, die sich problemlos auf einem kommerziell erhältlichen DNA/RNA-Synthesizer automatisieren lassen. Hierbei sind keine Abänderungen der üblicherweise verwendeten Reagenzien oder Syntheseprotokolle nötig.

Die signalgebende Reportergruppe kann jedes beliebige signalgebende Molekül sein, das sich über einen entsprechenden Linker an ein Phosphoramidit ankoppeln läßt. Der Linker sorgt dafür, daß nach erfolgter Umsetzung des Phosphoramidits mit dem Oligomer auf der festen Phase und nach Detektion der Reportergruppe eine Abspaltung der Reportergruppe erfolgen kann. Signalgebende Reportergruppen können beliebige fluoreszierende, farbgebende, radioaktive, chemolumineszierende Verbindungen sein. Bevorzugt sind fluoreszierende Verbindungen, wie Dansylethanol, Fluorescein oder Pyren. Beispiele für weitere Reportergruppen sind für die Ankopplung an die Phosphatgruppe geeignet derivatisierte Derivate von Cy3, Cy5, Dabsylchlorid, TAMRA, Hexachlorofluorescein. Erfindungsgemäß kann die

Reportergruppe bereits mit der Phosphateinheit verbunden sein, wenn diese mit dem Oligomer verbunden wird (1-stufiger Prozeß, s. Fig. 1 und 5) oder es kann der Linker mittels einer Phosphateinheit an das Oligomer gebunden werden bevor die Reportergruppe mittels einer weiteren Phosphateinheit angeknüpft wird (2-stufiger Prozeß, s. Fig. 6).

Der 1-stufige Prozeß ist ausführlich in Beispiel 1 beschrieben. Kennzeichnend für den 1-stufigen Prozeß ist, daß das Reportermolekül (z.B. Fluoreszenz-Tag) und der abspaltbare Linker Teile eines einzigen chemischen Moleküls (z.B. 2-Cyanoethyl-2-dansylethyl-N,N-diisopropyl-phosphoramidit) sind. Dieses wird im Rahmen des letzten Schrittes der Oligonukleotid-Synthese auf den Chip kondensiert. Nach Oxidation, um einen stabilen Phosphodiester zu bilden, wird der Chip mittels Nachweis der Reportergruppe auf seine Qualität gecheckt. Danach wird die Reportergruppe, z.B. durch Basenbehandlung, entfernt. Vorzugsweise, aber nicht notwendigerweise, können die Phosphatschutzgruppen im gleichen Schritt oder erst später entfernt werden. Zurückgelassen wird eine Phosphateinheit als Anhängsel an einem Ende des jeweiligen Oligomerstrangs. Dann kann der Array in Standardexperimenten (z.B. in Hybridisierungen) eingesetzt werden.

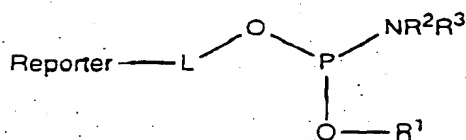
Beim 1-stufigen Prozeß enthält der Linker eine durch Säure, Base oder Licht spaltbare Einheit (nachstehend: X), z.B. Sulfonylethyl, 2-(2,2-dicarboxyethyl)propyl, 2-(2-nitrophenyl)propyl, 2-(2-nitrophenyl)ethyl. Desweiteren enthält der Linker für die Anknüpfung der signalgebenden Reportergruppe eine Hydroxy- oder Amino-Funktion (nachstehend: H). Weiter enthält der Linker einen Spacer (nachstehend: M), der die spaltbare Einheit (X) von der Amino- oder Hydroxylfunktion (H) räumlich trennt. Der Linker (L) kann deshalb durch folgende allgemeine Formel wiedergegeben werden:



mit X = spaltbare Einheit
 H = Hydroxyl oder Amino
 M = Alkyl-, Aryl, usw.

Vor der Kondensation an den Oligomerarray wird ein Reagenz gebildet, bei dem der Linker mit einer Phosphitamid-Einheit und mit der Reportergruppe verbunden

ist. Die Anknüpfung der Reportergruppe erfolgt mittels geeigneter Reporter-Derivate. Bevorzugt sind Anknüpfungen an die Hydroxy- oder Amino-Funktion (H) über eine Ester- oder Amid- oder Sulfonamid-Brücke, da hierfür kommerziell geeignete derivatisierte Verbindungen (z.B. Carbonsäuren, Sulfonylchloride) nahezu aller bekannten Reportergruppen verfügbar sind. Das Reagenz hat folgende allgemeine Formel:



L = spaltbare Linker-Einheit

R¹ = Phosphatschutzgruppe, z.B. β-Cyanoethyl, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl, 2-(4-cyanophenyl)ethyl

R² = Isopropyl-, Ethyl, Methyl-

R³ = Isopropyl-, Ethyl, Methyl-

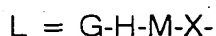
Reporter = signalgebende Reportereinheit

Beim 1-stufigen Prozeß ist ein Linkersystem vom Typ 2-(4-Aminophenylsulfonyl)ethyl- bevorzugt, wobei auch andere dem Fachmann bekannte spaltbare Linker einsetzbar sind. Die Verwendung von 2-(4-Aminophenylsulfonyl)ethanol erlaubt durch Umsetzung der Aminofunktion mit signalgebenden Reportergruppen, die eine Sulfonyl- oder Carboxylgruppe tragen, den Zugang zu nahezu allen bekannten signalgebenden Reportergruppen.

Beim 2-stufigen Prozeß (s. Fig. 6) sind das Reportermolekül (z.B. Fluoreszenz-Tag) und der abspaltbare Linker (z.B. Sulfonylethyl-Linker) Teile von zwei verschiedenen chemischen Molekülen.

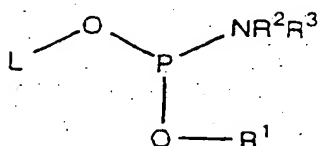
Als Linker im 2-stufigen Prozeß kommen bevorzugt Phosphateinheiten mit spaltbaren Einheiten zum Einsatz. Die Linker (nachstehend: L) haben bevorzugt für die Anknüpfung der nächsten Phosphateinheit eine geschützte Hydroxyl- oder Amino-funktion (nachstehend: H). Geeignete Hydroxyl- oder Amino-Schutzgruppen (nachstehend: G) sind dem Fachmann bekannt und sind z.B. säurelabil (z.B. Dimethoxytrityl, Monomethoxytrityl), basenlabil (z.B. Fmoc) oder photolabil (z.B. MeNPOC, NPPOC). Der Linker enthält weiter eine durch Säure, Base oder Licht spaltbare Einheit (nachstehend: X), z.B. Sulfonylethyl, 2-(2,2-dicarboxyethyl)propyl, 2-(2-nitrophenyl)propyl, 2-(2-nitrophenyl)ethyl). Weiter enthält der Linker einen Spacer (nachstehend: M), der die spaltbare Einheit (X) von der Amino- oder

Hydroxylfunktion (H) räumlich trennt. Der Linker (L) kann deshalb durch folgende allgemeine Formel wiedergegeben werden:



mit X = spaltbare Einheit
H = Hydroxyl oder Amino
G = Schutzgruppe für H
M = Alkyl-, Aryl, usw.

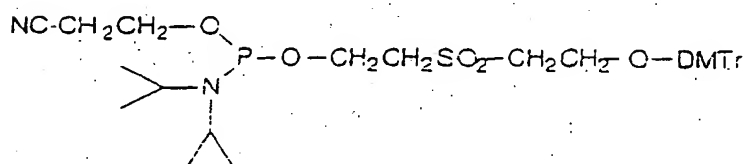
Der Linker wird mit einer Phosphoramid-Einheit verbunden. Das entstehende Linker-Phosphoramidit-Reagenz wird dann wie vorstehend beschrieben an den Oligomer-Array kondensiert. Das Linker-Phosphoramidit-Reagenz hat vorzugsweise folgende allgemeine Formel:



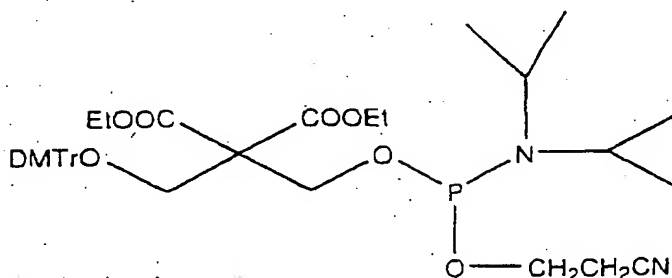
L = geschützter spaltbarer Linker (s.oben)
R¹ = Phosphatschutzgruppe, z.B. β-Cyanoethyl, 2-(4-Nitrophenyl)ethyl, 2-(4-cyanophenyl)ethyl
R² = Isopropyl-, Ethyl, Methyl-
R³ = Isopropyl-, Ethyl, Methyl-

Bevorzugte Linker-Phosphoramidit-Verbindungen im 2-stufigen Prozeß sind:

2-[2-(4,4'-dimethoxytrityloxy)ethylsulfonyl]ethyl-(2-cyanoethyl)-
(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit
(Eurogentec, Liege, Belgium)



[3-(4,4'-Dimethoxytrityloxy)-2,2-dicarboxyethyl]propyl-(2-cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphoramidite



Eine bevorzugte Ausführungsform des 2-stufigen Prozesses ist in Fig. 6 beschrieben. Zuerst wird das Linker-Phosphoramidit-Reagenz (z.B. 2-[2-(4,4'-dimethoxytrityloxy)ethylsulfonyl]ethyl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidit) an den Oligomerarray kondensiert. Nach Oxidation, um eine stabile Phosphat-Bindung zu erzeugen (und event. Capping, um unkontrollierte Kettenverlängerungen zu verhindern) und Entfernen der eingesetzten terminalen Schutzgruppe (z.B. der Dimethoxytrityl-Gruppe durch Säure-Behandlung) wird eine Reportergruppe (z.B. eine mit Phosphoramidit derivatisierte Cy5-Gruppe = Cy5-Phosphoramidit; Fa. Pharmacia) an die spaltbare Linker-Einheit ankondensiert. Nach Oxidation, um eine stabile Phosphodiesterbindung zu bilden, wird der Array "gescannt" (z.B. durch Fluoreszenz-Scanning), um die vorher angebrachte Reportergruppe nachzuweisen. Durch Abspaltung des Linkers (z.B. durch Basenbehandlung im Fall des Sulfonyl-ethyl-Linkers) wird die Reportergruppe im gleichen Schritt mitentfernt. Vorzugsweise, aber nicht notwendigerweise, können die Phosphatschutzgruppen im gleichen Schritt oder erst später entfernt werden. Zurückgelassen wird eine Phosphateinheit als Anhängsel an einem Ende des jeweiligen Oligomerstrangs. Dann kann der Array in Standardexperimenten (z.B. in Hybridisierungen) eingesetzt werden.

Das Verfahren kann auf beliebige Oligomerraster aus Oligonukleotiden/Nucleinsäurebiopolymeren angewendet werden, z.B. aus DNA, RNA und/oder Analogen davon. Unter Analogen sind beispielsweise Phosphorthioate, PNA, modifizierte DNA- oder RNA-Nucleinsäuren (z.B. 2'-O-Methyl-) oder auch andere Nucleinsäure-Typen mit verändertem "Backbone" oder Zucker (z.B. pRNA, homo-DNA, alpha-para-NA) oder deren Chimären zu verstehen. Desweiteren läßt sich das Reportergruppen-markierte Phosphoramidit auch mit dem N-terminalen Ende von Peptiden/Proteinen umsetzen und wie vorstehend beschrieben verwenden.

Die Qualitätskontrolle erfolgt beispielsweise bei einer fluoreszenten Reporter-Gruppe dadurch, daß der feste Träger, auf dem sich das markierte Oligomerraster befindet, mit einem für diesen Farbstoff geeigneten Lesegerät (z.B. Fluoreszenz-Mikroskop, Fluoreszenz-Scanner) ausgewertet wird. Hierbei wird vom Lesegerät für alle Oligomer-Positionen ein relativer Intensitätswert, der der relativen

Menge an synthetisiertem Oligomer an dieser Stelle entspricht, ermittelt. Ein Vergleich der ermittelten relativen Intensitäten zueinander erlaubt einen quantitativen Vergleich der jeweiligen Belegung mit Oligomer an allen Stellen des Trägers bzw. gibt Auskunft über die Qualität des synthetisierten Oligomer-Rasters. Dieser Vergleich der relativen Intensitäten an den verschiedenen Positionen des Rasters erlaubt im Folgeschritt (Auswertung eines Hybridisierungs-Experiments des Oligomer-Chips mit Sonden) einen sicheren Vergleich der Intensitäten, die sich hierbei ergeben. Beispielsweise, wenn beim Qualitäts-Check für eine bestimmte Position nur eine geringe Oligomer-Konzentration relativ zu einer anderen gemessen wird, kann bei Verwendung dieses Chips in einem Hybridisierungsexperiment für diese Position erwartungsgemäß auch nur eine geringe Intensität relativ zu anderen ermittelt werden.

Nach erfolgter Qualitätskontrolle wird die Reportergruppe wieder abgespalten. Dies erfolgt bei Reportergruppen, die über ein Sulfonylethyl-ähnliches System an die Phosphor/Phosphatgruppen gebunden sind, durch Behandlung mit einer starken Base, z.B. DBU, Ammoniak, DBN, Diisopropylethylamin.

Das Verfahren läßt sich automatisieren und ist daher zum Massenscreening großer Chipchargen geeignet.

Die Erfindung wird weiter anhand der Figuren erläutert, welche zeigen:

- Fig. 1: Herstellung Phosphoramidit (2-Cyanoethyl-2-dansylethyl-N,N-diisopropyl)phosphoramidit)
- Fig. 2: Kopplung des Phosphoramidits an das Oligomer
- Fig. 3: Durchführung der Qualitätskontrolle
- Fig. 4: Abspaltung der Reportergruppe

Fig. 5: Schema des erfindungsgemäßen Verfahrens (1-Schritt-Verfahren)

Fig. 6: Schema des erfindungsgemäßen Verfahrens (2-Schritt-Verfahren).

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele näher erläutert.

Beispiel 1

Qualitätskontrolle an einem Oligomercip

a) Herstellung von (2-Cyanoethyl-2-dansylethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidit

4,83 g 2-Dansylethanol (17,3 mmol) und 5,92 ml Diisopropylethylamin (34,6 mmol) werden in 30 ml wasserfreiem Dichlormethan aufgelöst und in einem Eisbad gekühlt. Dann werden langsam 4,5 g Chlor-(2-Cyanoethoxy)-diisopropylaminophosphan (19,0 mmol) zugesetzt. Das Eisbad wurde entfernt. Es wurde weitergerührt, bis die DC eine vollständigen Umsetzung anzeigte. Das Reaktionsgemisch wurde mit einer gesättigten Natriumbicarbonatlösung und Dichlormethan extrahiert, die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Das so erhaltene Öl wurde mittels Flash-Chromatographie (50g SiO₂; Toluol/Ethylacetat; 0-20% Ethylacetat) gereinigt. 5,7g des Produkts wurden als fluoreszierendes Öl erhalten. Die Ausbeute betrug 69%. Das Reaktionsschema ist in Fig. 1 gezeigt.

b) Kopplung des (2-Cyanoethyl-2-dansylethyl-N,N-diisopropyl)-phosphoramidits an das Oligomere

Die Ankopplung erfolgt automatisch mit Hilfe eines DNA-Synthesizers. Hierzu wird das fluorescent-markierte Phosphoramidit analog eines 'normalen' Nucleosidbausteins (-Phosphoramidits) in trockenem Acetonitril gelöst (0.5 molar) und auf

die bereits bestehenden, an der festen Phase befindliche Oligomere aufkondensiert. Dies erfolgt unter Zuhilfenahme von Tetrazol. Üblicherweise erfolgt nach der Kondensation am DNA-Synthesizer ein sog. Capping-Schritt (z.B. Reagenz Essigsäureanhydrid mit Acylierungskatalysator N-Methylimidazol), um das unkontrollierte Weiter-Wachsen der Oligomerenkette zu verhindern; dieser Schritt ist hier nicht notwendig, stört aber auch nicht, da mit dem fluoreszenz-markierten Phosphoramidit ohnehin die Oligomerenkette das Ende des Wachstums erreicht hat. Wichtig ist der nachfolgende Oxidationsschritt, der die instabile Phosphor(III)- in eine stabile Phosphor(V)-Verbindung überführt. Hierzu wird eine Jod/Pyridin/THF/-Wasser-Mischung benutzt. Nun steht der so fluoreszenz-markierte DNA-Chip sofort zur qualitativen Überprüfung durch einen geeigneten Array-Reader zur Verfügung. Das Reaktionsschema ist in Fig. 2 gezeigt.

c) Durchführung der Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle erfolgt direkt im Anschluss an (b). Hierbei wird durch Bestrahlung des Chip mit der für den Farbstoff geeigneten Wellenlänge (Dansyl: 350 nm) die Fluoreszenz angeregt. Die Emission der Fluoreszenz (Dansyl: 510 nm) wird dann durch einen geeigneten Reader (Fluoreszenzmikroskop oder Fluoreszenzscanner) für jede Position des Chip ausgelesen und quantifiziert (typischerweise Graustufenwerte). Ist z.B. an einer bestimmten Rasterposition gar keine Fluoreszenz detektierbar, obwohl dort eine Oligomerensequenz aufgebaut sein sollte, so kann daraus gefolgert werden, daß an dieser Position die Synthese nicht erfolgreich war. Dieser Chip soll dann verworfen werden. Durch Vergleich der gemessenen Intensitäten kann auf die Menge der an dieser Position synthetisierten Oligomers geschlossen werden. Dies kann dann bei der Verwendung des Oligomer-Chips in Hybridisierungsexperimenten berücksichtigt werden. So kann dann für jeden einzelnen Chip ein Qualitätsprofil durch die realtiven Fluoreszenzintensitäten aller Rasterpositionen (z.B. im Sinne einer Excel-Tabelle) erstellt werden. Dies hilft dem Anwender entsprechend bei der Auswertung seiner Hybridisierungsexperimente. Das Reaktionsschema ist in Fig. 3 gezeigt.

d) Abspaltung der Dansylverbindung

Nach erfolgreichem Qualitäts-Check kann die Dansylverbindung durch Behandlung mit einer starken Base, z.B. DBU oder DBN wieder abstrahiert werden. Dies wird zweckmaessig durch Schwenken des Oligomer-Chip in der Base erreicht. Im Falle des oben angeführten Dansylfarbstoffes und unter Verwendung von 1 M DBU in Acetonitril ist das bereits spätestens nach 1-2 min erreicht. Gleichzeitig mit der Abspaltung des Dansylrestes erfolgt simultan die Abspaltung der β -Cyanoethyl-Phosphatschutzgruppe. Die Reste (Styrol-Derivate) des Dansyl- und der Cyanoethyl-Gruppen verbleiben in der basischen Lösung und können einfach gewaschen werden. Der DNA-Chip steht nach der Abspaltung und nach Waschen sofort für die angestrebte Verwendung (z.B. Hybridisierungsexperimente) zur Verfügung. Die am Oligomer verbleibende Phosphat-Gruppierung erhöht zudem vorteilhafterweise die Temperatur, bei der die Hybridisierungsexperimente erfolgen können. Das Reaktionsschema ist in Fig. 4 gezeigt.

PATENTANSPRÜCHE

- 1) Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, dadurch gekennzeichnet, daß man an bestimmten Rasterpositionen gebundenen Oligonukleotiden eine Phosphateinheit, die mit einer signalgebenden Reportergruppe spaltbar verknüpft ist bzw. wird, ankondensiert, anhand des Signals der Reportergruppe den Grad der Oligomersynthese bestimmt und anschließend die Reportergruppe wieder abspaltet.
- 2) Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Oligonukleotide aus DNA, RNA und/oder Analoga bestehen.
- 3) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Reportergruppe eine fluoreszierende, farbgebende, radioaktive, oder chemolumineszierende Gruppe ist.
- 4) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Abspaltung der Reportergruppe unter basischen Bedingungen erfolgt.
- 5) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß im Falle der Verwendung einer fluoreszierenden Gruppe das Signal der Reportergruppe mittels Fluoreszenz-Mikroskop oder Fluoreszenz-Scanner bestimmt wird.
- 6) Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Verknüpfung zwischen Phosphateinheit und Reportergruppe mittels eines Linkers erfolgt.
- 7) Abspaltbare Markierung zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, dadurch gekennzeichnet, daß es aus einer Phosphateinheit und einer signalgebenden

den Reportergruppe und ggf. einem Linker besteht.

- 8) Markierung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die signalgebende Reportergruppe eine fluoreszierende Gruppe ist.

1/6

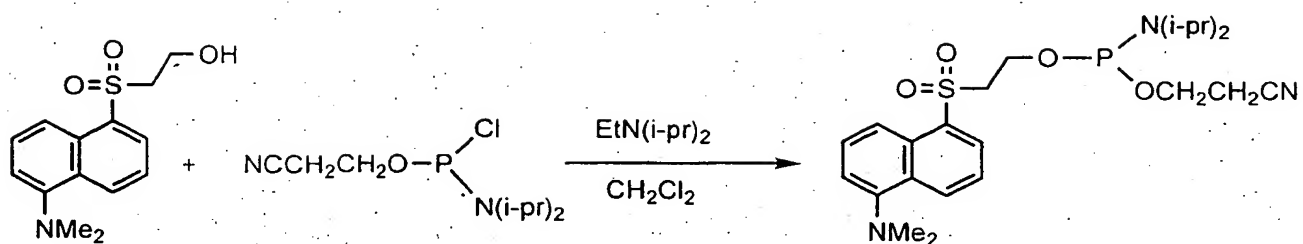


Fig.1

2/6

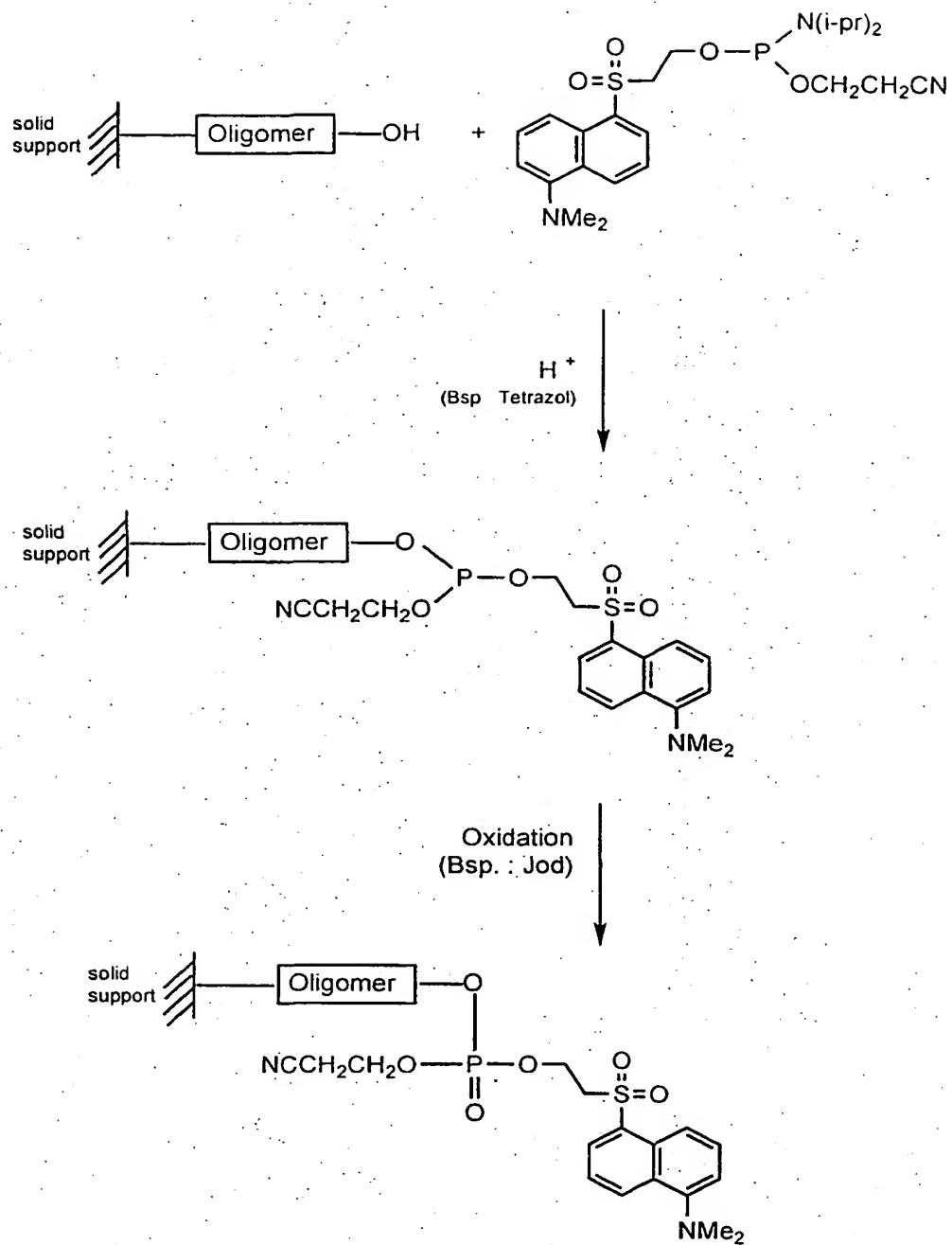


Fig.2

3/6

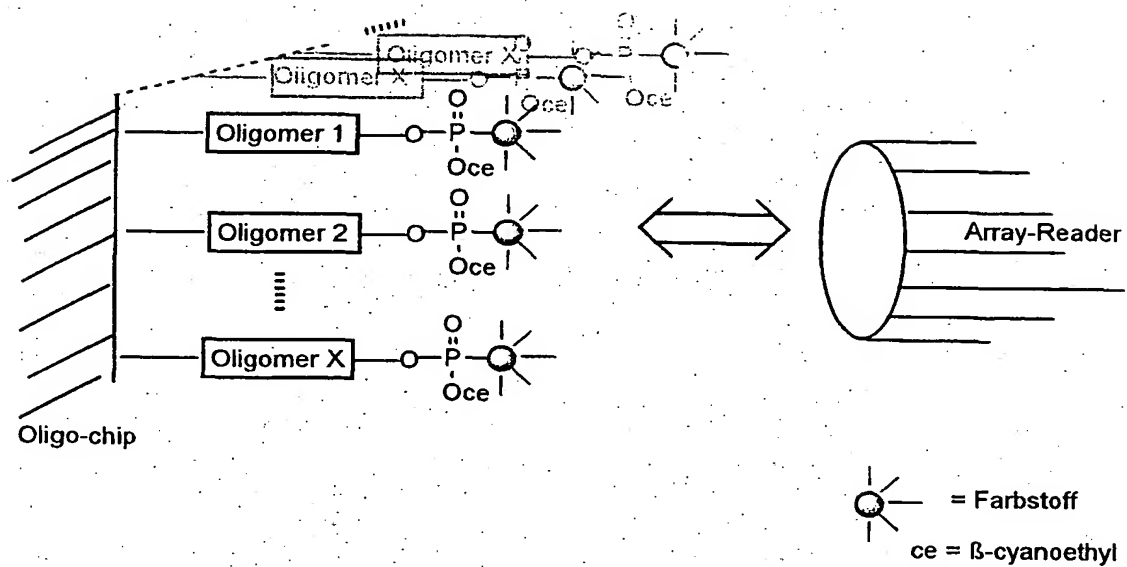


Fig.3

4/6

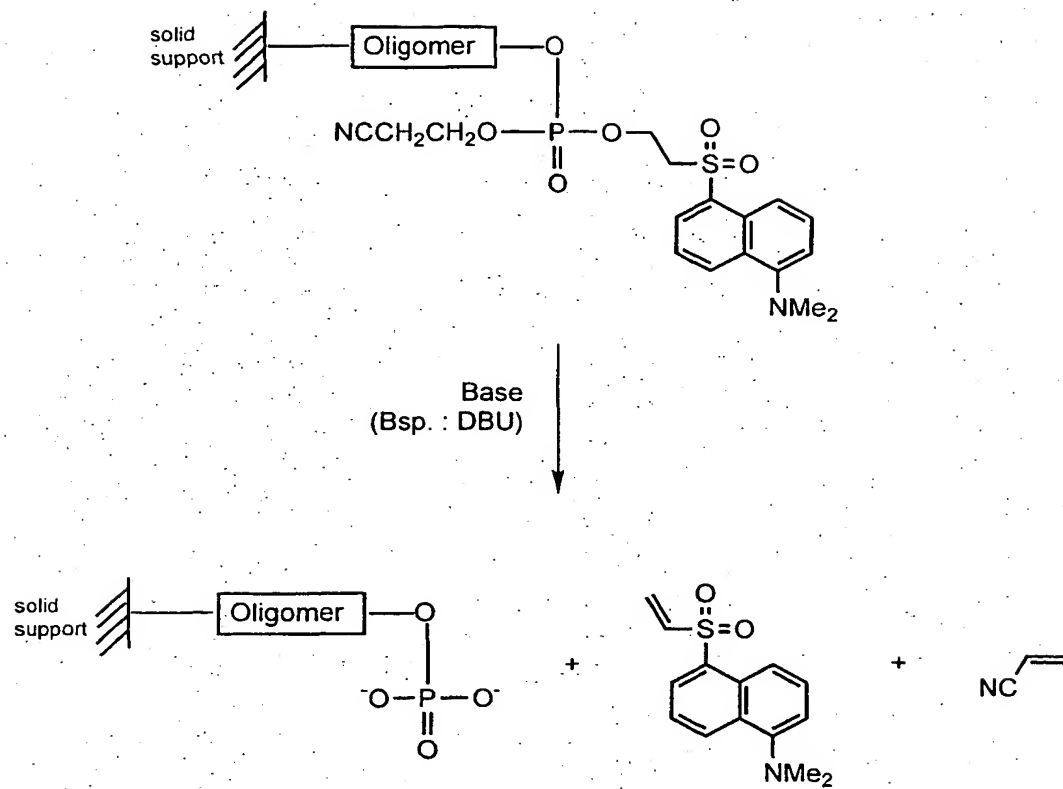


Fig.4

5/5

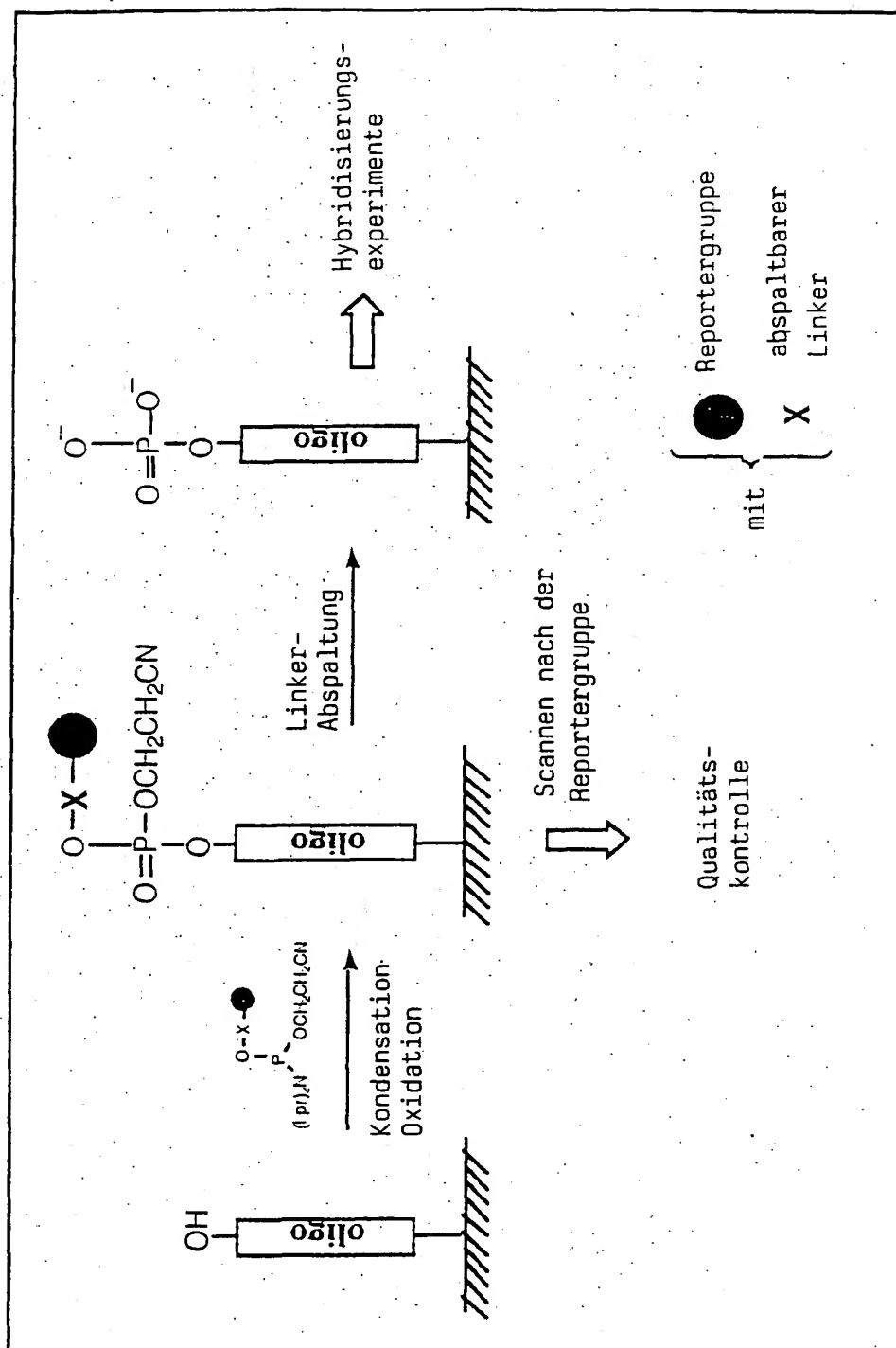


Fig. 5

Zwei-Schritt-Qualitäts-Assay:

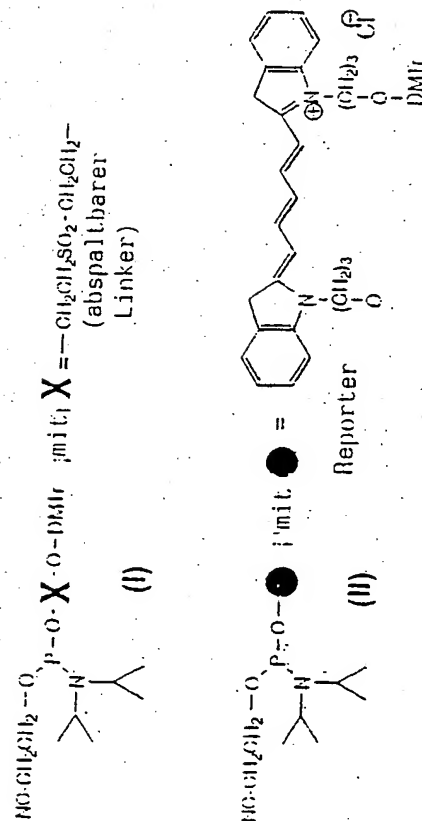
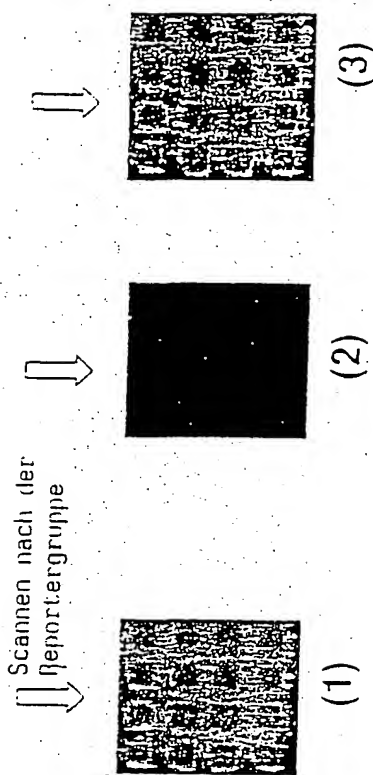
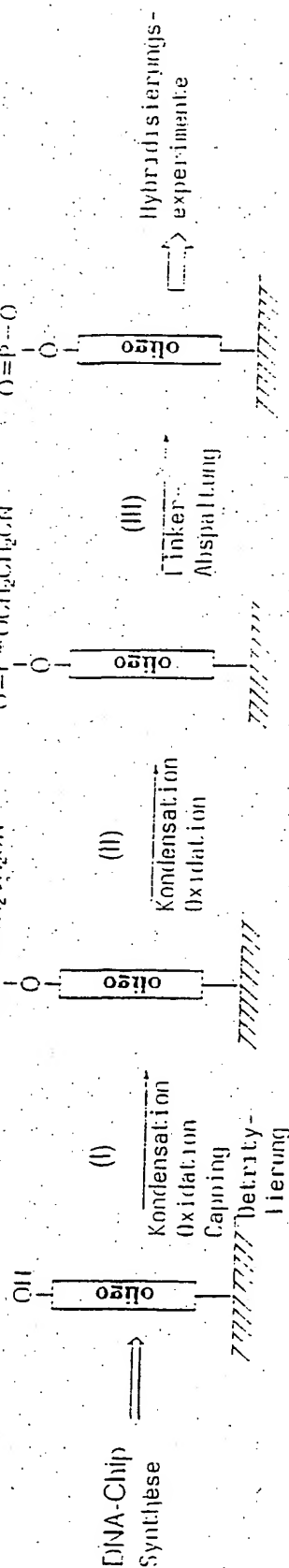


Fig. 6

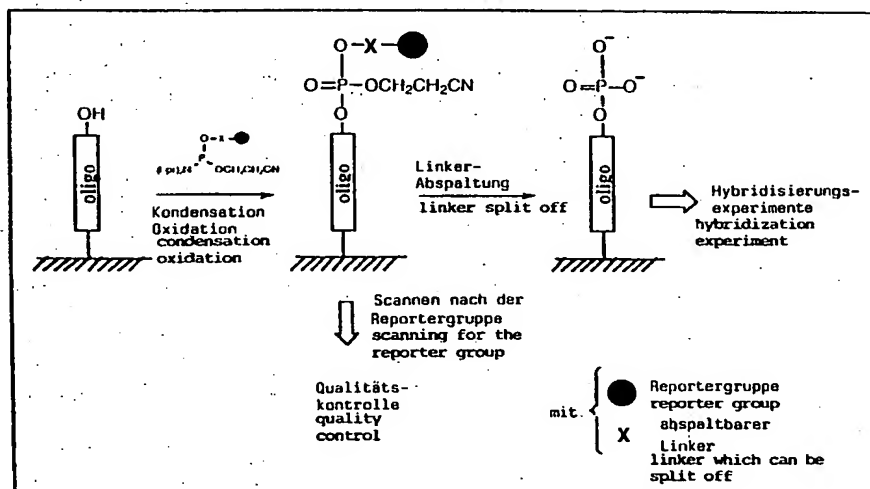


PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12Q 1/68, B01J 19/00</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/15837</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 23. März 2000 (23.03.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02975</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 15. September 1999 (15.09.99)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 198 42 164.8 15. September 1998 (15.09.98) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BEIER, Markus [DE/DE]; Werdenstrasse 42a, D-69120 Heidelberg (DE).</p> <p>(74) Anwalt: SCHÜSSLER, Andrea; Huber & Schüssler, Trud- eringer Strasse 246, D-81825 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p> <p>(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 25. Mai 2000 (25.05.00)</p>	

(54) Title: **METHOD FOR CONTROLLING QUALITY IN THE CONSTRUCTION OF OLIGOMER GRIDS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR QUALITÄTSKONTROLLE BEIM AUFBAU VON OLIGOMERRASTERN**



(57) Abstract

The invention relates to a method for controlling the quality of oligomer grids. The method is characterised in that a phosphate unit is fused to certain grid positions (if it is not already fused to said grid positions), said phosphate unit being linked to a signal-generating reporter group, the degree of oligomer synthesis is determined using the signal of the reporter group, and the reporter group is then split off again.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Qualitätskontrolle von Oligomerrastern, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man an bestimmte Rasterpositionen eine Phosphateinheit, die mit einer signalgebenden Reportergruppe verknüpft ist bzw. wird, ankondensiert, anhand des Signals der Reportergruppe den Grad der Oligomersynthese bestimmt und anschließend die Reportergruppe wieder abspaltet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/02975

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12Q1/68 B01J19/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q B01J

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WEILER J ET AL: "COMBINING THE PREPARATION OF OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS AND SYNTHESIS OF HIGH-QUALITY PRIMERS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, US, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, vol. 243, no. 2, 15 December 1996 (1996-12-15), pages 218-227, XP000684351 ISSN: 0003-2697 the whole document	1-8
Y	EP 0 818 460 A (HOECHST AG) 14 January 1998 (1998-01-14) abstract page 8, line 26 - line 34	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 March 2000

Date of mailing of the international search report

22/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Knehr, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. ional Application No

PCT/DE 99/02975

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 196 25 397 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 8 January 1998 (1998-01-08) the whole document ----	
A	EP 0 475 443 A (HOECHST AG) 18 March 1992 (1992-03-18) the whole document ----	
A	WEILER J UND HOEISEL J D: "Picomole synthesis of high quality oligonucleotide primers in combination with the preparation of oligonucleotide arrays" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, vol. 16, no. 7-9, 1997, pages 1793-1796, XP002132646 the whole document ----	
A	WO 97 39151 A (AFFYMETRIX INC ;GOLDBERG MARTIN (US); DIGGELMAN MARTIN (CH); HUBBE) 23 October 1997 (1997-10-23) the whole document ----	
A	WO 94 08047 A (FANG PING ;GORDON JULIAN (US); JOU TSUNG HUI (US); ABBOTT LAB (US)) 14 April 1994 (1994-04-14) abstract; example 1 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/02975

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0818460 A	14-01-1998	DE 19627898 A AU 2855297 A CA 2210031 A JP 10072486 A NO 973217 A US 5936077 A	15-01-1998 22-01-1998 11-01-1998 17-03-1998 12-01-1998 10-08-1999
DE 19625397 A	08-01-1998	WO 9749714 A EP 0915897 A	31-12-1997 19-05-1999
EP 0475443 A	18-03-1992	DE 4029244 A AT 113031 T AU 641882 B AU 8386591 A CA 2051217 A DE 59103277 D DK 475443 T ES 2065595 T FI 914293 A HU 63432 A IE 65094 B JP 5320122 A NO 178333 B NO 950427 A,B, NO 950428 A,B, NO 951911 A,B, NO 960691 A NO 960692 A NZ 239766 A PT 98963 A,B US 5631362 A US 5945524 A ZA 9107306 A	19-03-1992 15-11-1994 30-09-1993 19-03-1992 15-03-1992 24-11-1994 03-04-1995 16-02-1995 15-03-1992 30-08-1993 04-10-1995 03-12-1993 27-11-1995 16-03-1992 16-03-1992 16-03-1992 21-02-1996 21-02-1996 26-05-1994 31-08-1992 20-05-1997 31-08-1999 27-05-1992
WO 9739151 A	23-10-1997	US 5959098 A AU 2804797 A CA 2251755 A EP 0950112 A	28-09-1999 07-11-1997 23-10-1997 20-10-1999
WO 9408047 A	14-04-1994	AU 4848393 A	26-04-1994

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02975

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 C12Q1/68 B01J19/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 C12Q B01J		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WEILER J ET AL: "COMBINING THE PREPARATION OF OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS AND SYNTHESIS OF HIGH-QUALITY PRIMERS" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, US, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, CA, Bd. 243, Nr. 2, 15. Dezember 1996 (1996-12-15), Seiten 218-227, XP000684351 ISSN: 0003-2697 das ganze Dokument	1-8
Y	EP 0 818 460 A (HOECHST AG) 14. Januar 1998 (1998-01-14) Zusammenfassung Seite 8, Zeile 26 - Zeile 34	1-8
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen: "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 9. März 2000		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 22/03/2000
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Bediensteter Knehr, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. .ionales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02975

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 196 25 397 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 8. Januar 1998 (1998-01-08) das ganze Dokument ---	
A	EP 0 475 443 A (HOECHST AG) 18. März 1992 (1992-03-18) das ganze Dokument ---	
A	WEILER J UND HOHEISEL J D: "Picomole synthesis of high quality oligonucleotide primers in combination with the preparation of oligonucleotide arrays" NUCLEOSIDES & NUCLEOTIDES, Bd. 16, Nr. 7-9, 1997, Seiten 1793-1796, XP002132646 das ganze Dokument ---	
A	WO 97 39151 A (AFFYMETRIX INC ;GOLDBERG MARTIN (US); DIGGELMAN MARTIN (CH); HUBBE) 23. Oktober 1997 (1997-10-23) das ganze Dokument ---	
A	WO 94 08047 A (FANG PING ;GORDON JULIAN (US); JOU TSUNG HUI (US); ABBOTT LAB (US)) 14. April 1994 (1994-04-14) Zusammenfassung; Beispiel 1 -----	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02975

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0818460 A	14-01-1998	DE 19627898 A	15-01-1998
		AU 2855297 A	22-01-1998
		CA 2210031 A	11-01-1998
		JP 10072486 A	17-03-1998
		NO 973217 A	12-01-1998
		US 5936077 A	10-08-1999
DE 19625397 A	08-01-1998	WO 9749714 A	31-12-1997
		EP 0915897 A	19-05-1999
EP 0475443 A	18-03-1992	DE 4029244 A	19-03-1992
		AT 113031 T	15-11-1994
		AU 641882 B	30-09-1993
		AU 8386591 A	19-03-1992
		CA 2051217 A	15-03-1992
		DE 59103277 D	24-11-1994
		DK 475443 T	03-04-1995
		ES 2065595 T	16-02-1995
		FI 914293 A	15-03-1992
		HU 63432 A	30-08-1993
		IE 65094 B	04-10-1995
		JP 5320122 A	03-12-1993
		NO 178333 B	27-11-1995
		NO 950427 A,B,	16-03-1992
		NO 950428 A,B,	16-03-1992
		NO 951911 A,B,	16-03-1992
		NO 960691 A	21-02-1996
		NO 960692 A	21-02-1996
		NZ 239766 A	26-05-1994
		PT 98963 A,B	31-08-1992
		US 5631362 A	20-05-1997
		US 5945524 A	31-08-1999
		ZA 9107306 A	27-05-1992
WO 9739151 A	23-10-1997	US 5959098 A	28-09-1999
		AU 2804797 A	07-11-1997
		CA 2251755 A	23-10-1997
		EP 0950112 A	20-10-1999
WO 9408047 A	14-04-1994	AU 4848393 A	26-04-1994

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.